



Artigo de Investigação Médica
Mestrado Integrado em Medicina

IMPORTÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-CLÍNICA NA AJUDA À CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS DO SONO QUE CURSAM COM HIPERSONOLÊNCIA DIURNA

António Moreira e Costa

Orientador

Professor Doutor António Martins da Silva

Co-Orientadores

Dra. Cláudia Carvalho

Dr. João Lopes

Porto - 2017

Importância da caracterização genético-clínica na ajuda à classificação das doenças do sono que cursam com hipersonolência diurna

António Moreira e Costa

mim11095@icbas.up.pt

6º Ano do Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313 Porto

Dissertação / Projecto / Estágio

Artigo de Investigação Médica

(Mestrado Integrado em Medicina)

Orientador

Professor Doutor António Martins da Silva - Médico Neurologista e Neurofisiologista, Assistente Graduado Sénior/Chefe de Serviço de Neurofisiologia, Director do Serviço de Neurofisiologia do Centro Hospitalar do Porto

Co-Orientadores

Dra. Cláudia Carvalho - Investigadora no Laboratório de Imunogenética do ICBAS

Dr. João Lopes - Médico Neurologista e Neurofisiologista, Assistente Graduado de Neurofisiologia no Serviço de Neurofisiologia do Centro Hospitalar do Porto

Índice

Nota Prévia	3
Resumo	4
Abstract	5
Glossário	6
Introdução	7
Objectivos	15
Métodos	15
Resultados	16
Discussão	18
Referências bibliográficas	21
 Anexo 1 (<i>"Contribution of HLA characterization for the definition of the hypersomnolence"</i>)	 25

Nota Prévia

No presente trabalho, os estudos laboratoriais de imunogenética foram realizados no Laboratório de Imunogenética (Directora: Prof^a M. Berta Silva) do Departamento de Patologia e Imunologia Molecular do ICBAS - Universidade do Porto e os Estudos Poligráficos do Sono no Serviço de Neurofisiologia (Director: Prof. A. Martins da Silva) do Departamento de Neurociências do Hospital de Santo António / Centro Hospitalar do Porto, a quem se agradece a colaboração.

Ambos os estudos (laboratoriais e poligrafias) decorreram no âmbito de estudos clínicos “de rotina”, isto é, não foram realizados especificamente para este trabalho.

O candidato, em colaboração estreita com a co-orientadora, reviu e ajudou à reorganização dos dados laboratoriais de imunogenética e à estruturação final dos dados incluídos. É da sua responsabilidade não só a organização do texto como também a organização do algoritmo de ajuda à orientação do diagnóstico diferencial entre as entidades estudadas. O orientador e co-orientadores (Dr^a Cláudia Carvalho e Dr. João Lopes) fizeram o acompanhamento crítico da investigação.

O trabalho foi apresentado na Reunião Internacional da *European Narcolepsy Network*, realizada em Palma de Maiorca, Espanha, em Março de 2017.

O aluno,



António Moreira e Costa

O Orientador,



Professor Doutor António Martins da Silva

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Classificação Internacional de Distúrbios do Sono (3ª edição) considera oito entidades clínicas que têm a hipersonolência diurna como queixa principal. Três destas entidades - Narcolepsia do Tipo 1 (N1), do Tipo 2 (N2) e Hipersónia Idiopática (HI) - são de diagnóstico diferencial difícil entre si. Para ultrapassar esta dificuldade tem sido proposta a identificação dos alelos do HLA da classe II, com os quais foi verificada uma forte associação a essas entidades.

OBJECTIVOS: Analisar a distribuição das frequências alélicas dos genes HLA-DQB1 e HLA-DQA1 numa população de doentes com N1, N2 ou HI e verificar se a identificação destes alelos contribui para a sua diferenciação.

MÉTODOS: Estudaram-se 135 indivíduos distribuídos pelas três entidades (N1=54, N2=17 e HI=64), para os quais foi feita a genotipagem para os alelos HLA-DQB1 e HLA-DQA1. Foram comparadas as frequências alélicas entre os diferentes grupos de indivíduos e uma população controlo (PC) (n=206).

RESULTADOS: Verificou-se um aumento da frequência do alelo HLA-DQB1*06:02 nos grupos N1 (70.37%) e N2 (41.18%) em relação à PC (16.02%), com valores de prova de 1.472×10^{-15} e 0.0094, respectivamente. Encontraram-se diferenças para o mesmo alelo quando comparadas as populações de doentes entre si, assinalando-se o maior valor de p de 1.997×10^{-12} entre N1 e HI. A frequência do alelo HLA-DQB1*02 estava aumentada no grupo HI quando comparado com a PC (59.38% vs 34.47%; $p=3.888 \times 10^{-4}$). As comparações entre sub-populações de doentes com exclusão destes alelos (N1 e N2 sem DQB1*06:02 e HI sem DQB1*02) mostraram uma maior frequência dos alelos DQB1*05 na HI (HI vs N1, $p=0.0133$; HI vs N2, $p=0.0425$), DQA1*01 também na HI (HI vs N2, $p=0.0069$), DQA1*02 na N2 (N2 vs HI, $p=0.0198$) e DQA1*03 também na N2 (N2 vs N1, $p=0.0276$).

CONCLUSÕES: A integração de dados clínicos e registos poligráficos de sono com a identificação dos alelos do HLA classe II contribui para diferenciação entre N1, N2 e HI. Desenvolvendo um algoritmo em que as diversas variáveis estão consideradas, verificamos que a presença do alelo HLA-DQB1*06:02 permite distinguir as narcolepsias da HI, por ser mais frequente nas primeiras, mas também N1 de N2, já que valida uma cataplexia (em N1). O alelo HLA-DQB1*02 pode ser usado para distinguir HI de N2 (pois é mais frequente na HI). Todavia, quando este alelo está ausente e também ausente o HLA-DQB1*06:02, a identificação do HLA-DQA1*02 sugere N2, enquanto que a identificação do HLA-DQB1*05 e/ou do HLA-DQA1*01 sugere a HI.

PALAVRAS-CHAVE: hipersonolência diurna; narcolepsia; hipersónia idiopática; cataplexia; hipocretina; distúrbios do sono; HLA classe II; HLA-DQB1; HLA-DQA1; HLA-DQB1*06:02;

ABSTRACT

INTRODUCTION: The International Classification of Sleep Disorders (Third Edition) describes eight clinical entities in which daytime sleepiness is shared as the primary complaint. Three of these entities – Narcolepsy Type 1 (N1), Type 2 (N2) and Idiopathic Hypersomnia (IH) – are particularly difficult to differentiate from each other. HLA class II genotyping has been suggested to help solving this diagnostic problem, as there is a strong association between some HLA alleles and these sleep disorders.

OBJECTIVES: To analyze the distribution of the HLA-DQB1 and HLA-DQA1 alleles in a population composed of individuals diagnosed with N1, N2 or IH and verify if the identification of such alleles is helpful to differentiate them.

METHODS: A cohort of 135 individuals was studied (N1=54, N2=17 e IH=64), whose HLA-DQB1 and DQA1 alleles were determined. The allele frequencies of the different groups were compared with each other and with a population control (PC) (n=206).

RESULTS: The allele HLA-DQB1*06:02 was overrepresented in N1 (70.37%) and N2 (41.18%) groups when compared with PC (16.02%), with p values of 1.472×10^{-15} and 0.0094, respectively. Differences in the same allele were found when comparing patient groups with each other, with a p value of 1.997×10^{-12} standing out, between N1 and IH. HLA-DQB1*02 frequency was increased in the IH group when compared with PC (59.38% vs 34.47%; $p=3.888 \times 10^{-4}$). Comparing sub-populations (where these two alleles were excluded: N1 and N2 without DQB1*06:02 and IH without DQB1*02), an overrepresentation was found for the following alleles: DQB1*05 in IH (IH vs N1, $p=0.0133$; IH vs N2, $p=0.0425$), DQA1*01 also in IH (IH vs N2, $p=0.0069$), DQA1*02 in N2 (N2 vs IH, $p=0.0198$) and DQA1*03 also in N2 (N2 vs N1, $p=0.0276$).

CONCLUSIONS: The combination of clinical and sleep polygraphic data with HLA class II alleles identification is helpful differentiating N1, N2 and IH. Designing an algorithm in which the different variables are considered, we found that the presence of HLA-DQB1*06:02 helps distinguish narcolepsies from IH, as well as N1 from N2, as its presence validates a suspected cataplexy (in N1). HLA-DQB1*02 can be used to differentiate IH from N2 when this allele is present (more often in IH), but also if not present, as if in the absence also of HLA-DQB1*06:02, the identification of DQA1*02 suggests N2, whereas identification of DQB1*05 and/or DQA1*01 suggests IH.

KEYWORDS: daytime sleepiness; narcolepsy; idiopathic hypersomnia; cataplexy; hypocretin; sleep disorders; HLA class II; HLA-DQB1; HLA-DQA1; HLA-DQB1*06:02;

GLOSSÁRIO

HADM – Hipersónia por Alteração/Distúrbio Médico

HDP – Hipersónia associada a um Distúrbio Psiquiátrico

HI – Hipersónia Idiopática

HLA classe II –Antigénios Leucocitários Humanos da classe II (*“Human Leucocyte Antigen”*)

HMS – Hipersónia por Medicação ou Outras Substâncias

ICSD-3 – Classificação Internacional de Distúrbios do Sono, Terceira Edição (*“International Classification of Sleep Disorders, Third edition”*)

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

N1 – Narcolepsia do Tipo 1

N2 – Narcolepsia do Tipo 2

PC – População Controlo

PN – Polissonografia Nocturna

Sono não-REM – ciclo de sono lento

Sono REM – ciclo de sono com movimentos oculares rápidos (*“Rapid Eye Movement Sleep”*)

SII – Síndrome do Sono Insuficiente

SOREMP – período de sono REM iniciado nos primeiros 15 minutos de sono (*“Sleep-Onset REM Periods”*)

TLMS – Teste de Latências Múltiplas do Sono

TTS – tempo total de sono

INTRODUÇÃO

Entre as várias entidades nosológicas propostas na “Classificação Internacional de Distúrbios do Sono - 3ª Edição” (da sigla em inglês *ICSD-3*) surge um grupo de distúrbios do sono denominado de “Hipersônias de Origem Central” (“*Central Disorders of Hypersomnolence*”), do qual fazem parte oito entidades que partilham a hipersônia diurna como queixa principal, não causada por alterações do sono noturno ou por desregulação dos ciclos circadianos ⁽¹⁾. A hipersônia diurna (“*daytime sleepiness*”) é um sintoma que se define pela incapacidade de um indivíduo se manter desperto e alerta durante os principais períodos de vigília do dia, resultando em períodos de uma necessidade irrepresível de dormir, ou lapsos de adormecimento ou sono, não intencionais ⁽¹⁾. Nesta classificação, o termo “hipersônia” é utilizado para descrever o sintoma, enquanto que o termo “hipersónia” se reporta a distúrbios do sono propriamente ditos, ou seja, a uma entidade clínica. As entidades referidas são a Narcolepsia do Tipo 1 (N1), a Narcolepsia do Tipo 2 (N2), a Hipersónia Idiopática (HI), o Síndrome de Kleine-Levin, a Hipersónia por Alteração/Distúrbio Médico, a Hipersónia por Medicação ou Outras Substâncias, a Hipersónia Associada a um Distúrbio Psiquiátrico, e o Síndrome do Sono Insuficiente.

As entidades N1, N2 e HI são frequentemente de difícil diagnóstico diferencial entre si quando uma das hipóteses é colocada. O objectivo principal deste trabalho é contribuir para a sua identificação. Os restantes quadros de hipersônia diurna são mais facilmente identificados. A *Síndrome de Kleine-Levin* caracteriza-se pela ocorrência de episódios de hipersônia severa, com períodos de sono de duração igual ou superior a 18 horas, aos quais se associam pelo menos uma das seguintes alterações: cognitivas, da percepção e comportamentais, que incluem desinibição (hipersexualidade) e/ou distúrbios alimentares (anorexia ou hiperfagia) ⁽¹⁾. Surge na segunda década de vida e predomina no sexo masculino ^(1, 2). Ocorre seguindo um padrão de remissão-recidiva, com intervalos assintomáticos de duração variável (podendo ocorrer um episódio sintomático por mês ou a cada 12 meses). Os períodos de hipersônia e sintomas associados são também de duração variável (média de 10 dias) ⁽¹⁾. Nos períodos assintomáticos não ocorrem alterações ⁽¹⁾. O primeiro episódio é frequentemente despoletado por uma infecção ou consumo de álcool ⁽¹⁾. A fisiopatologia da síndrome não é ainda conhecida, mas estudos por imagem funcional e electroencefalografia indicam a presença de uma “encefalopatia multifocal” durante os episódios, atingindo o hipotálamo e lobos temporal e frontal. Tais alterações poderão ter etiologia auto-imune, genética, inflamatória ou metabólica ⁽¹⁾. A história natural da síndrome dita a sua resolução espontânea na idade adulta, em média 14 anos após a sua instalação ⁽¹⁾, tendo até lá ocorrido entre 12 e 19 episódios ⁽²⁾.

A *Hipersónia por Alteração/Distúrbio Médico* (HADM), é uma entidade em que a hipersônia diurna é atribuída a uma condição médica subjacente, neurológica ou não ⁽¹⁾. Os doentes poderão apresentar paralisia do sono, alucinações hipnagógicas (envolvendo fenómenos visuais, auditivos e tácteis) que ocorrem na transição entre a vigília e o sono ^(1, 3), ou comportamento automático ⁽¹⁾. O diagnóstico pode ser baseado apenas em critérios clínicos ⁽¹⁾. Na suspeita de HADM e co-existência de distúrbios do sono relacionados com a respiração (como a Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono), o diagnóstico apenas é assumido se a hipersônia persistir após o tratamento adequado do distúrbio da respiração ⁽¹⁾. Várias condições médicas poderão causar a hipersónia: doenças genéticas (ex: Síndrome de Prader-Willi e distrofia

miotónica), metabólicas (ex: encefalopatia metabólica), neoplásicas (ex: tumores cerebrais), inflamatórias (ex: estados de inflamação sistémica, como infecções crónicas ou doenças reumatológicas), endócrinas (ex: hipotireoidismo) ou traumáticas (ex: traumatismo crânio encefálico) ⁽¹⁾.

Relativamente à *Hipersónia por Medicação ou Outras Substâncias* (HMS), a hipersonolência diurna tem origem em fármacos ou substâncias indutoras do sono, ou no efeito causado pela remoção de agentes estimulantes da vigília ⁽¹⁾. No primeiro grupo incluem-se fármacos com efeito sedativo (como benzodiazepinas, opióides e anticonvulsivantes) e substâncias de abuso (como álcool e marijuana) ⁽¹⁾. O efeito sedativo dos fármacos é particularmente sentido em indivíduos idosos ou com múltiplas patologias médicas ⁽¹⁾. Quanto ao segundo grupo, a descontinuação abrupta do consumo de estimulantes causa frequentemente hipersonolência diurna. Por exemplo, consumidores habituais de café ou outros produtos contendo cafeína podem apresentar hipersonolência, fadiga e falta de atenção durante 2 a 9 dias após descontinuação do consumo ⁽¹⁾.

A *Hipersónia associada a um Distúrbio Psiquiátrico* (HDP) é identificada quando a hipersonolência diurna co-existe com um distúrbio psiquiátrico diagnosticado (ex: distúrbios do humor, de conversão, de adaptação, ou de personalidade), não sendo melhor explicada por outro distúrbio do sono, condição médica ou efeito de fármacos ou substâncias ⁽¹⁾. Este tipo de hipersónia surge mais frequentemente no sexo feminino, entre os 20 e os 50 anos ⁽¹⁾. Apesar das queixas de hipersonolência, os estudos em laboratório de sono não as objectivam ⁽¹⁾. A causa subjacente a este distúrbio não é conhecida, e a falta de concordância entre dados subjectivos e objectivos coloca várias questões acerca da sua verdadeira etiologia ⁽¹⁾.

Por último, na *Síndrome do Sono Insuficiente* (SII) a hipersonolência diurna é causada pela incapacidade em o indivíduo obter a quantidade de sono necessária para manter níveis normais de vigília, resultando numa privação crónica do sono (a maior parte dos dias em pelo menos 3 meses) ⁽¹⁾. Outros distúrbios do sono terão de ser excluídos como causa da hipersonolência. Esta síndrome está presente em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, embora mais frequente na adolescência, em que há tendência para atrasar o sono ⁽¹⁾. Adicionalmente poderão estar presentes paralisia do sono e alucinações hipnagógicas ⁽¹⁾. A avaliação em laboratório de sono mostra que a entrada no sono e manutenção do mesmo são normais, assim como evidencia uma elevada eficiência do sono (acima de 90%) ⁽¹⁾. A presença de um Teste de Latências Múltiplas do Sono (ver adiante) anormal que objective um menor tempo de latência ao adormecimento pode fazer com que a síndrome seja confundida com a narcolepsia, ou HI ⁽¹⁾.

Como inicialmente assinalamos, com este estudo procuramos ajudar à distinção entre a Narcolepsia do Tipo 1 (N1), do Tipo 2 (N2) e a Hipersónia Idiopática (HI). Em relação a N1 e N2, a divisão em dois tipos é feita de acordo com o cumprimento de critérios clínicos e laboratoriais (Quadro I). Alguns destes critérios são comuns a ambas as entidades, outros têm como objectivo a distinção entre os dois tipos de narcolepsia: a presença de cataplexia e/ou de baixos níveis de péptidos de hipocretina (neuropéptidos que intervêm na regulação do sono e da vigília ⁽¹⁾) no líquido céfalo-raquidiano (LCR) identifica N1, enquanto que a ausência de cataplexia e níveis normais de hipocretina (ou se não determinados) identifica N2. O estudo em laboratório de sono procura objectivar a hipersonolência e evidenciar a dissociação do sono REM (ocorrência do sono

REM para além do sono nocturno), característica das narcolepsias ⁽¹⁾. É executada uma Polissonografia Nocturna (PN), seguida de um Teste de Latências Múltiplas do Sono (TLMS) no dia seguinte ⁽⁴⁾. Este teste mede o intervalo de tempo necessário para que o indivíduo adormeça, em 4-5 sestas diurnas consecutivas ⁽⁴⁾. A presença de períodos SOREMP (acrónimo de “*Sleep-Onset REM Periods*”) durante o exame, períodos de sono REM iniciados nos primeiros 15 minutos de sono, é considerada a marca electrofisiológica das narcolepsias ⁽⁵⁾. Para o diagnóstico deve encontrar-se no mínimo 2 SOREMPs e uma média de latência ao sono inferior ou igual a 8 minutos ⁽¹⁾.

A cataplexia define-se como a ocorrência de episódios de perda súbita e geralmente breve - menos de 2 minutos - do tónus muscular, normalmente bilateral e simétrica, com manutenção da consciência, sendo precipitada por emoções fortes, sobretudo positivas (como a alegria e emoções associadas ao riso), ainda que a ira e a surpresa sejam também emoções precipitantes ^(1, 6, 7). Trata-se do mais específico dos sinais de dissociação do sono REM e é exclusiva de N1. A cataplexia está presente na maioria dos indivíduos narcolépticos (60% a 75% do total de narcolepsias ⁽⁸⁻¹⁰⁾) e nestes, também na sua maioria (90% a 95% ⁽¹⁾) existe uma diminuição ou mesmo ausência de hipocretina no LCR. A elevada frequência de níveis baixos de hipocretina em indivíduos narcolépticos com cataplexia torna este défice um marcador fundamental nestes doentes ⁽¹⁾. Como tal, a N1 é entendida como uma narcolepsia com défice de hipocretina ⁽³⁾, tendo sido mesmo estabelecido o défice deste neuropéptido como a causa da doença ^(1, 3). A cataplexia não está presente na totalidade dos doentes N1, mas nesses casos, pouco frequentes ⁽¹⁾, os níveis de hipocretina estarão obrigatoriamente diminuídos, ditando o mesmo diagnóstico. O acompanhamento destes doentes mostra que a maioria acaba por desenvolver cataplexia mais tarde ⁽¹¹⁾, colocando em relevo a associação directa entre o défice de hipocretina e a própria cataplexia ^(12, 13). Contudo, a ICSD-3 também admite o diagnóstico de N1 a indivíduos com cataplexia e níveis normais de hipocretina (embora pouco frequentes) ^(14, 15), o que coloca a hipótese de a narcolepsia com cataplexia poder ser causada por outros factores que não só o défice de hipocretina ⁽³⁾. Por outro lado, os doentes N2 não apresentam cataplexia e, na sua maioria, apresentam níveis normais de hipocretina. Como o diagnóstico de N2 não obriga ao seu doseamento, existem doentes com défice real do neuropéptido (desconhecido) que, por não apresentarem cataplexia, são erradamente classificados como N2 ^(1, 3). Esta classificação das narcolepsias focada nos níveis de hipocretina reflecte uma organização do subtipo de doença mais de acordo com marcadores moleculares do que com fenótipos clínicos ⁽³⁾.

Quanto às manifestações clínicas das narcolepsias, estas são bastante sobreponíveis entre os dois subtipos da doença ⁽³⁾. É classicamente descrita uma téttrade de sintomas em doentes N1: hipersonolência diurna, cataplexia, paralisia do sono e alucinações hipnagógicas ou hipnopômicas (que ocorrem na transição entre o sono e a vigília) ^(1, 3). Raramente estes sintomas se apresentam em simultâneo enquanto manifestações inaugurais da doença (menos de 10% dos doentes), o que faz com que haja um atraso no diagnóstico de cerca de 10,5 anos ^(1, 16, 17). A hipersonolência diurna é o sintoma mais incapacitante e ocorre sobretudo em situações quotidianas monótonas ⁽¹⁾. Caracteristicamente, as sestas são reparadoras para os doentes, mas a hipersonolência recorre após períodos de tempo variáveis ^(1, 3). Com excepção para a cataplexia, os restantes sintomas desta téttrade estão também presentes em N2 e na HI, ainda que com menor frequência e nunca em simultâneo ⁽¹⁸⁾. Adicionalmente, podem associar-se também às

narcolepsias alterações do sono nocturno (como fragmentação do sono) ⁽¹⁸⁾, sendo mais severas (menor eficiência do sono) em doentes N1 ⁽¹⁹⁾.

Tipicamente, as narcolepsias surgem durante a adolescência ou em idades adultas jovens ⁽³⁾. No caso particular de N1 foi encontrada uma distribuição bimodal para a idade de instalação da doença, com o primeiro pico aos 15 anos e o segundo aos 35 anos ⁽²⁰⁾. Quanto à prevalência destas doenças, N1 apresenta uma prevalência conhecida entre 0.025% e 0.05% ^(10, 21), ainda que haja uma variação geográfica interessante, com prevalências mais elevadas no Japão (0.16%) e menores em Israel (0.002%) ⁽²²⁾. Esta variação pode-se-á explicar pelas diferentes prevalências de determinados factores de risco genéticos e ambientais ⁽³⁾. Quanto a N2, a sua prevalência exacta não é conhecida, mas corresponderá a 15% - 25% do total de narcolepsias ⁽¹⁾. Ambos os sexos são afectados por N1 e N2, com uma ligeira maior frequência em homens (1.6 - 1.8 : 1) ^(10, 20).

Quanto aos factores de risco para as narcolepsias, são vários os factores genéticos já identificados. Entre os genes com maior evidência de associação a estes distúrbios estão os genes do HLA (sistema antigénio leucocitário humano) classe II. Em particular, a forte associação do alelo HLA-DQB1*06:02 a estas entidades tem sido registada por vários autores, sendo mesmo considerado como o principal factor genético de susceptibilidade para a narcolepsia, associada ou não a cataplexia, sobretudo se em homozigotia ^(9, 23-26). As elevadas frequências deste alelo encontradas em N1 permitem mesmo assumir que quase todos estes doentes são portadores do alelo ⁽³⁾, contrastando com os cerca de 40%-45% de doentes N2 ^(1, 9) e os 12-38% da população geral ^(1, 3). Especificamente, foi demonstrada uma associação entre o mesmo alelo e a cataplexia ⁽²⁷⁾, ainda suportada pela constatação de que a frequência deste alelo está aumentada ao considerar-se indivíduos narcolépticos com episódios de cataplexia mais severos ⁽⁹⁾. Para além da associação à cataplexia, foi igualmente demonstrada a correlação com o défice de hipocretina ^(25, 28). Assim, foi proposto que a identificação do DQB1*06:02 seja utilizada para validar a presença de cataplexia quando suspeita em indivíduos narcolépticos, e deste modo confirmar o diagnóstico de N1 ⁽²⁷⁾. Importa salientar que, por estar também presente em indivíduos N2 e na população geral, a identificação do alelo HLA-DQB1*06:02 isoladamente não tem valor diagnóstico. No caso particular de doentes N2, cerca de 40% - 45% destes são portadores do alelo, mas só 24% terão níveis baixos de hipocretina ⁽¹⁾. Como tal, a probabilidade de que um qualquer doente narcoléptico sem cataplexia portador do alelo HLA-DQB1*06:02 tenha baixos níveis de hipocretina é de aproximadamente 56%. Assim, a presença do alelo não pode ser utilizada para estimar indirectamente os níveis de hipocretina, nem para diagnosticar N2 ⁽¹⁾. Pode ser útil, contudo, se a genotipagem demonstrar ausência do alelo pois nesse caso assume-se com grande segurança que os níveis de hipocretina estarão normais, evitando-se a punção lombar ⁽¹⁾. Relativamente aos indivíduos N2 que possuem níveis normais de hipocretina, não são conhecidos factores de risco genéticos ou ambientais que possam predispor à doença ⁽¹⁾.

O alelo HLA-DQB1*06:02 está em *linkage* com o alelo HLA-DQA1*01:02, fazendo com que a maioria dos indivíduos portadores do primeiro sejam também do segundo ⁽³⁾. No entanto, o alelo HLA-DQA1*01:02 pode associar-se a outros alelos DQB1 e nesses casos o risco para N1 é apenas ligeiramente aumentado, ou mesmo sem risco acrescido ^(25, 29). Outros alelos HLA da classe I e II (HLA-A, B e C, e outras variantes HLA-DQ e HLA-DP ^(30, 31)) foram também associados a uma maior ou menor (efeito protector) susceptibilidade para a narcolepsia, ainda que com menor influência sobre o risco. Estarão ainda implicados outros genes para além dos alelos HLA, como

genes codificantes de moléculas que interagem com proteínas da região HLA ou que regulam respostas auto-imunes ⁽³⁾. Por exemplo, foram encontrados *loci* de susceptibilidade para N1 no gene TRA (que codifica a cadeia α do receptor das células T) e no gene P2RY11 (que codifica o receptor purinérgico P2Y₁₁, expresso em células CD8⁺) ⁽³²⁾.

Quanto a factores de risco ambientais para N1, têm sido sugeridos vários factores predisponentes à doença, ainda que sem confirmação subsequente ^(1, 3). Em 2009, aquando da pandemia do vírus Influenza A - H1N1 registou-se um aumento da incidência de N1 entre a população tratada com a vacina *Pandermix* ⁽³³⁾, mas a causalidade entre a vacina e a N1 não foi provada ⁽³⁾. Outros factores reportados como possíveis factores de risco são a presença de história recente de infecção respiratória vírica ^(34, 35), infecções estreptocócicas ^(36, 37), traumatismo cranioencefálico, privação crónica do sono e alterações bruscas dos padrões de sono. ⁽¹⁾

Em relação à patogénese da N1, a sua causa foi já estabelecida, devendo-se ao défice de hipocretina ^(1, 3, 38-41). Admite-se que a perda de neurónios hipotalámicos responsáveis pela sua produção seja o resultado de uma resposta auto-imune ou imune-mediada específica contra os mesmos, em indivíduos geneticamente susceptíveis ⁽¹⁸⁾. Ainda que a etiologia auto-imune não tenha sido ainda demonstrada de modo conclusivo ⁽⁴²⁾, alguns dos dados que a apoiam são a associação da doença a haplótipos HLA ⁽²⁵⁾, e a presença de anticorpos e células T auto-reactivos em amostras de sangue de doentes N1 ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Em relação a N2, a sua patogénese não é conhecida, admitindo-se ser uma doença heterogénea ^(1, 18). Nos doentes com baixos níveis de hipocretina a patogénese será a mesma que a da N1 ⁽¹⁾. Nos doentes com níveis normais de hipocretina desconhece-se qual a patofisiologia que cause a hipersonolência e os achados laboratoriais que a objectivam ⁽¹⁾. Uma hipótese que tem sido explorada é a de que haja um défice apenas parcial de hipocretina, talvez causado por uma lesão menos extensa sobre o hipotálamo, suficiente para causar a hipersonolência, mas não para causar cataplexia e níveis baixos de hipocretina quando doseada ^(1, 46).

Quanto à Hipersónia Idiopática, esta é entendida como um diagnóstico de exclusão, em que existem queixas de hipersonolência diurna, ausência de cataplexia e presença de achados laboratoriais que objectivam a presença de hipersonolência, sendo excluídas outras razões que justifiquem o distúrbio ⁽¹⁾. Manifestações clínicas adicionais que suportam o diagnóstico são a presença de “inércia do sono” e/ou de sestas longas (duração superior a 1 hora), que diferentemente das sestas da N1 ⁽¹⁾, geralmente não são reparadoras ⁽⁴⁷⁾. A “inércia do sono” trata-se de um estado de transição entre o sono e a vigília definido por uma dificuldade prolongada em acordar, com períodos de re-adormecimento, baixa vigília e *performance*, comportamento automático, irritabilidade e confusão ^(1, 48), ocorrendo de um modo particularmente severo nestes doentes ⁽⁴⁸⁾. Podem ocorrer também alucinações hipnagógicas e paralisia do sono, embora a frequência com que ocorram seja variável e não conhecida ^(1, 18). Estas manifestações clínicas tornam a HI clinicamente mais próxima da N2 do que da N1, para além de partilharem a ausência de cataplexia ⁽¹⁸⁾. Podem ainda estar presentes sintomas sugestivos de uma disfunção do sistema nervoso autónomo, como cefaleias, percepção de desregulação da temperatura, queixas vasculares periféricas com extremidades frias e alterações ortostáticas ⁽¹⁾.

O diagnóstico de HI exige a avaliação do doente em laboratório de sono com a realização de uma PN e um TLMS, com o objectivo de documentar a hipersonolência. A combinação de ambos os exames não mostra mais do que 1 período SOREMP ⁽¹⁾. Adicionalmente, o diagnóstico

exige o registo de uma das seguintes alterações: uma média de latência ao sono igual ou inferior a 8 minutos; um tempo total de sono em 24 horas igual ou superior a 660 minutos ⁽¹⁾. Contudo, alguns doentes que cumprem os restantes critérios clínicos de diagnóstico para HI (Quadro I) não apresentam nenhuma destas duas últimas alterações. Nesses casos o diagnóstico de HI não é imediatamente excluído, podendo ser atribuído com base na restante avaliação clínica, e caso a suspeita clínica se mantenha elevada é recomendada a repetição do TLMS posteriormente ⁽¹⁾. Refira-se aqui que o TLMS pode não ser um exame suficientemente sensível para o diagnóstico, uma vez que o valor de *cut-off* (8 minutos) é o mesmo que o utilizado para o diagnóstico das narcolepsias, por uma questão de simplicidade, sem que tivesse sido determinado de forma independente um valor próprio para a HI ^(18, 49). Este valor de *cut-off* excluiria 22% a 39% dos doentes que de outra forma cumprem os critérios clínicos para hipersónia e até 71% dos doentes com hipersonolência e tempos de sono prolongados (mais de 600 minutos) ^(50, 51). Por forma a ultrapassar a baixa sensibilidade do TLMS para a HI, a ICSD-3 adicionou a medição total do sono em 24h como critério, por forma a incluir os doentes com critérios clínicos de HI mas tempos de latência ao sono superiores a 8 minutos ⁽¹⁸⁾. Ainda que na HI o tempo de latência ao sono seja geralmente diminuído em relação à população geral, é superior ao da maioria dos doentes com narcolepsia ⁽¹⁾. É também frequente registar-se uma elevada eficiência do sono (em média entre 90% e 94%) ⁽¹⁾ e um tempo total de sono (TTS) aumentado, elementos que podem levar a equacionar o diagnóstico de *Síndrome do Sono Insuficiente*, pelo que esta última entidade deve ser excluída. Tal exclusão faz-se, se necessário, pela constatação de que não existe reversão da hipersonolência após prova terapêutica com um tempo de sono nocturno prolongado ⁽¹⁾. Os estudos de Polissonografia mostram ainda a ocorrência de sono REM e sono não-REM em proporções normais ⁽¹⁾ (aproximadamente 20% e 80%, respectivamente ⁽⁵²⁾).

Contrariamente à narcolepsia, a fisiopatologia da HI não é ainda conhecida, assumindo-se ser uma doença heterogénea ^(1, 18). Foi sugerida a presença de níveis baixos de histamina no LCR, quer em doentes com HI, quer em doentes com narcolepsia, mas estes achados não foram posteriormente confirmados ^(53, 54). Surgiu também a hipótese de doentes HI poderem ter níveis séricos totais de IgG superiores aos de uma população saudável (contrariamente a indivíduos narcolépticos com cataplexia em que estes níveis estão diminuídos), podendo este achado (assim como a distribuição de subclasses de IgG) estar relacionado com a produção de citocinas associada ao sono ⁽⁵⁵⁾. Foi também proposto que uma disfunção na actividade do receptor GABA_A possa contribuir para a hipersonolência ⁽⁵⁶⁾, mas será necessária maior evidência para estabelecer essa contribuição ⁽¹⁸⁾. Relativamente aos níveis de hipocretina no LCR, quando doseados são normais ⁽¹⁾. A predisposição familiar para a doença é mais frequente que em doentes narcolépticos com cataplexia, sendo também mais frequente que em doentes N2 ^(19, 57, 58). Em relação a uma possível etiologia genética, e apesar de a ICSD-3 referir que não são conhecidas associações da doença a alelos HLA ⁽¹⁾, alguns estudos (mas não todos) demonstram uma frequência significativamente elevada do alelo HLA-DQB1*06:02 nestes doentes ⁽⁵⁹⁾, assim como dos alelos HLA Cw2, DR5 e B27 (estes últimos em desequilíbrio de ligação), e menor frequência do DRB1*11 ^(50, 60, 61). Ainda em relação aos alelos do HLA, um estudo recente que analisou parte do coorte utilizado no presente trabalho encontrou uma maior frequência do alelo DQB1*02 em doentes HI (de entre uma população de doentes N1, N2 e HI) ⁽⁶²⁾. Foi também identificada uma maior frequência dos alelos dos genes NCKAP5, SPRED1 e CRAT numa população de doentes

japoneses diagnosticados com “hipersónia essencial” ⁽⁶³⁾ (uma entidade não identificada na ICSD-3 mas que parece incluir a N2 e a HI ⁽¹⁸⁾). Contudo, ainda não foi determinado se estes genes poderão predispor ou causar hipersonolência ⁽¹⁸⁾.

A prevalência exacta da doença não é conhecida ^(18, 64), mas na literatura existe um consenso de 0.002% a 0.010% ⁽⁶⁴⁾. Parece não existir diferenças na prevalência entre o sexo masculino ou feminino ⁽⁶⁴⁾. Quanto à história natural da HI, a idade de instalação dos sintomas varia entre o final da adolescência e metade da quarta década de vida ⁽⁶⁵⁾. Uma vez instalada, a doença mantém-se estável quanto à sua severidade, com um longo período de duração ⁽¹⁾. A remissão espontânea foi reportada em 14% a 25% dos doentes, o que não se verifica nas narcolepsias ^(18, 50).

Narcolepsia do Tipo 1	Narcolepsia do Tipo 2	Hipersónia Idiopática
A. Ocorrência diária de períodos de uma necessidade irrepresível de dormir ou lapsos de sono durante o dia, durante pelo menos 3 meses.	A. Ocorrência diária de períodos de uma necessidade irrepresível de dormir ou lapsos de sono durante o dia, durante pelo menos 3 meses.	A. Ocorrência diária de períodos de uma necessidade irrepresível de dormir ou lapsos de sono durante o dia, durante pelo menos 3 meses.
B. Presença de B1 e/ou B2.	B. Ausência de cataplexia.	B. Ausência de cataplexia.
B1. Cataplexia + TLMS que evidencia uma latência média ao sono ≤ 8 minutos e ≥ 2 SOREMPs (a presença de um período SOREMP na polissonografia noturna realizada na noite anterior pode substituir um dos SOREMP no TLMS).	C. TLMS que evidencia uma latência média ao sono ≤ 8 minutos e ≥ 2 SOREMPs (a presença de um período SOREMP na polissonografia noturna realizada na noite anterior pode substituir um dos SOREMP no TLMS).	C. TLMS que evidencia < 2 SOREMPs (caso seja realizada uma polissonografia noturna na noite anterior, o total de SOREMPs em ambos os estudos deverá ser < 2).
B2. Baixa [hipocretina] _{LCR} (≤ 110 pg/mL ou $< 1/3$ dos valores médios obtidos numa população controlo).	D. [hipocretina] _{LCR} indeterminada ou, se determinada, > 110 pg/mL ou $> 1/3$ dos valores médios obtidos numa população controlo.	D. Presença de D1 e/ou D2.
	E. A hipersonolência e/ou os achados no TLMS não são melhor explicados por outras causas.	D1. TLMS que evidencia latência média ao sono ≤ 8 minutos.
	NOTA: se no decorrer da história da doença surgir cataplexia, ou forem determinadas baixas [hipocretina] _{LCR} , o distúrbio é reclassificado como Narcolepsia do Tipo 1.	D2. Tempo total de sono em 24 horas ≥ 660 minutos, evidenciado por polissonografia de 24 horas ou actigrafia de pulso (obtida a média de horas de sono em ≥ 7 dias).
		E. Exclusão da Síndrome de Sono Insuficiente.
		F. A hipersonolência e/ou os achados no TLMS não são melhor explicados por outras causas.

Quadro I - **Critérios de Diagnóstico para a Narcolepsia do Tipo 1, do Tipo 2 e Hipersónia Idiopática.** Para cada uma das entidades, todos os critérios correspondentes devem estar presentes para o respectivo diagnóstico. TLMS – Teste de Latências Múltiplas do Sono; SOREMP – período REM no início do sono (do inglês Sleep Onset REM Period); [hipocretina]_{LCR} – concentração de hipocretina no líquido céfalo-raquidiano (adaptado de *International Classification of Sleep Disorders, Third Edition* ⁽¹⁾)

Dadas as definições anteriores, compreende-se que a dificuldade em chegar a um diagnóstico entre N1, N2 e HI seja muito maior, dada a similitude entre vários aspectos clínicos, quando se recorre aos critérios indicados pela ICSD-3, e uma vez que para as três entidades é utilizado sempre o mesmo (primeiro) critério (critério A), também presente na maioria das restantes 5 entidades: a presença diária de hipersonolência diurna durante pelo menos 3 meses ⁽¹⁾. Contudo, elementos relativos às restantes entidades (como história de doença psiquiátrica, consumo de substâncias indutoras do sono ou história de patologia médica) permitem o seu diagnóstico de um modo mais fácil.

A difícil diferenciação entre N1, N2 e HI obriga a que sejam combinados dados clínicos específicos aliados ao estudo em laboratório de sono, assumindo o TLMS particular importância ⁽¹⁸⁾. É verdade que entre estas três entidades existem dados clínicos mais próprios de cada uma, como a melhoria da sonolência após as sesta no caso das narcolepsias, contrariamente à HI, ou a raridade em encontrar fragmentação do sono nesta última ⁽¹⁸⁾, comum entre as narcolepsias. No entanto, nem sempre é possível caracterizar suficientemente bem determinado quadro sintomático para permitir indicar com clareza qual o distúrbio de sono presente. Mesmo os próprios sintomas constituintes da tétrada referida não permitem a distinção confiável entre as diferentes entidades ⁽¹⁸⁾. Existe demasiada sobreposição da clínica à apresentação, o que torna frequente a dúvida diagnóstica ⁽⁶⁶⁾. Em particular, é mais difícil a distinção entre a HI e N2 dada a semelhança clínica entre as duas ^(18, 67). Foi já demonstrado por um estudo japonês que essa semelhança é maior com doentes N2 não portadores do alelo DQB1*06:02 ⁽⁶⁸⁾. Este estudo demonstrou que doentes N2 portadores do alelo se aproximavam de doentes N1 quanto a características clínicas e laboratoriais (PN, TLMS e electroencefalografia), enquanto que doentes N2 não portadores e doentes HI eram mais próximos entre si para essas características ⁽⁶⁸⁾.

Se a presença de cataplexia evoca de imediato o diagnóstico de N1, a sua ausência coloca a dúvida de se poder tratar de HI, N2 ou mesmo N1 (quer por poder estar ausente, quer por ser difícil encontrá-la na anamnese ⁽¹⁾). Os próprios estudos de sono têm utilidade limitada, pois enquanto que a HI apresenta características laboratoriais próprias, nas narcolepsias os achados encontrados são os mesmos. Compreende-se pois a importância de uma avaliação segura acerca da presença de cataplexia, ou em alternativa, da determinação dos níveis de hipocretina. Todavia, uma vez que é possível encontrar indivíduos com níveis de hipocretina normais em ambas as entidades, a consideração deste último parâmetro de modo isolado não tem utilidade diagnóstica caso não esteja alterado. Mesmo a identificação da presença de cataplexia nem sempre é fácil, já que assume um fenótipo bastante heterogéneo entre os doentes ^(1, 3), bem como pode ser confundida com episódios que a mimetizam, encontrados em indivíduos normais (como a sensação de fraqueza muscular associada ao riso) ⁽¹⁾. Perante a dificuldade em assumir seguramente a cataplexia, esta é dada então como ausente, e estando presentes os restantes critérios (iguais para N1 e N2), os doentes são classificados como N2.

Em face destas dificuldades justifica-se assim o propósito deste trabalho: encontrar parâmetros biológicos para a orientação do diagnóstico de N1, N2 e HI.

OBJECTIVOS

Com o objectivo de ajudar à classificação mais segura destes três distúrbios, tem sido proposta a utilização da genotipagem do HLA classe II, uma vez que alguns alelos deste complexo surgem mais frequentemente em determinada entidade do que nas restantes.

No contexto das relações entre os antigénios da classe II do HLA e a N1, N2 e HI, é objectivo do presente estudo analisar a distribuição das frequências dos alelos HLA-DQB1 e HLA-DQA1 em doentes seguidos na Consulta do Sono do Hospital de Santo António / CHP, diagnosticados com uma das três entidades referidas que cursam com hipersonolência diurna e verificar se essa distribuição pode ser relevante para definir o tipo de distúrbio presente, de entre os três possíveis.

A distribuição das frequências alélicas foi ainda utilizada para ajudar a desenhar um algoritmo para auxílio à diferenciação entre estas entidades quando são consideradas como hipótese de diagnóstico.

MÉTODOS

Foi estudado um coorte de 135 doentes seguidos na Consulta do Sono do Hospital de Santo António / CHP por queixas de hipersonolência diurna. Todos os doentes foram avaliados clinicamente e em laboratório de sono (através de PN e TLMS no dia seguinte). O distúrbio de sono foi depois classificado como N1 (n=54), N2 (n=17) ou HI (n=64) de acordo com os critérios da ICSD-3 ⁽¹⁾ para estas 3 entidades. Os 135 doentes do coorte inicial foram distribuídos por 2 coortes a partir dos quais foram feitas as comparações estatísticas relativamente a dois genes: 135 doentes genotipados para o gene HLA-DQB1 e 117 genotipados para o gene HLA-DQA1. Os dados foram comparados com uma população controlo (PC) constituída por 206 indivíduos saudáveis oriundos da mesma região geográfica (genotipada apenas para o gene HLA-DQB1). Foram ainda formados sub-grupos de doentes e da população controlo a partir da exclusão (dos grupos originais) dos indivíduos portadores dos factores genéticos descritos como mais associados às entidades em estudo (com genotipagem para DQB1: N1 sem HLA-DQB1*06:02 = 16; N2 sem HLA-DQB1*06:02 = 10; HI sem HLA-DQB1*02 = 26; com genotipagem para DQA1: N1 sem HLA-DQB1*06:02 = 15; N2 sem HLA-DQB1*06:02 = 9; HI sem HLA-DQB1*02 = 23).

A genotipagem foi realizada no Laboratório de Imunogenética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (Universidade do Porto). Foram utilizadas amostras de sangue venoso periférico de 10 mL, colhidas em EDTA, em ambas as populações. O DNA genómico foi obtido a partir de leucócitos presentes nas amostras sanguíneas (após lise celular com proteinase K) através de um procedimento de *salting-out* ⁽⁶⁹⁾, sendo depois amplificado por meio de *Polymerase Chain Reaction* com *primers* específicos (*PCR-SSP*) para os genes HLA-DQB1 e DQA1 ⁽⁷⁰⁾. Os produtos de amplificação foram posteriormente separados por Electroforese em gel de agarose (1.5%) com brometo de etídio e observados sob luz ultra-violeta (UV), sendo deduzidos os genótipos a partir dos padrões de amplificação.

As frequências alélicas para ambos os genes foram determinadas por contagem directa e comparadas entre as diferentes populações através do teste chi-quadrado de Pearson ou do teste exacto de Fisher, como apropriado. Os valores médios foram comparados usando a distribuição t de Student.

RESULTADOS

A análise dos alelos HLA permitiu observar que a frequência do alelo HLA-DQB1*06:02 se encontra aumentada na população de doentes N1 e N2 (70.37% e 41.18%) quando comparada com a população controlo (PC) (16.02%), com valores de p de 1.472×10^{-15} e 0.0094, respectivamente (Quadro II). Na comparação das frequências para o mesmo alelo entre populações de doentes encontraram-se diferenças estatisticamente significativas para todas elas (N1=70.37% vs N2=41.18% vs HI=7.81%), assinalando-se o valor de p mais significativo ($p=1.997 \times 10^{-12}$) entre N1 e HI (Quadro III). Comparando a população de doentes HI com a PC foi encontrada uma frequência superior do alelo HLA-DQB1*02 nos doentes HI (59.38% vs 34.47%), com valor de p de 3.888×10^{-4} (Quadro II). O mesmo se verificou quando se comparou a população de doentes HI com doentes N1 ($p=4.723 \times 10^{-5}$), não tendo sido encontrada uma diferença estatisticamente significativa quando confrontada com a população N2 (Quadro III). Registou-se uma frequência mais baixa do alelo DQB1*03 na população N1 em comparação com a PC (33.33% vs 56.31%), com um valor de p de 0.0026 (Quadro II). Em relação aos resultados para o alelo HLA-DQA1, só foram efetuadas comparações entre grupos de doentes, uma vez que não existia genotipagem deste *locus* para a população controlo. Foi encontrada uma diferença significativa na frequência do alelo HLA-DQA1*01 entre a população N1 e as restantes, com maior frequência nesta população (N1=88.24% vs N2=62.50% vs HI=66.00%, com valores de prova no Quadro III).

Para os restantes alelos de DQB1 e DQA1 não foram encontradas diferenças com significado estatístico entre a população de doentes e a PC.

	População Controlo (n=206)		Hipersónia Idiopática (n=64)				Narcolepsia do Tipo 1 (n=54)				Narcolepsia do Tipo 2 (n=17)			
	n	%	n	%	p	OR	n	%	p	OR	n	%	p	OR
DQB1*02	71	34.47	38	59.38	3.888×10^{-4}	2.779	12	22.22	0.086	0.543	7	41.18	0.577	1.331
DQB1*03	116	56.31	32	50.00	0.376	0.776	18	33.33	0.0026	0.388	10	58.82	0.841	1.108
DQB1*06:02	33	16.02	5	7.81	0.099	0.444	38	70.37	1.472×10^{-15}	12.451	7	41.18	0.0094	3.670

Quadro II – *Frequências dos alelos HLA-DQB1*02, HLA-DQB1*03 e HLA-DQB1*06:02 nas populações de doentes com hipersonolência.* (Apresentam-se apenas os alelos para os quais foram encontradas diferenças com significado estatístico entre as populações.)

p – valor de prova; OR – odds ratio;

	Comparações	p	OR
DQB1*02	HI vs N1	4.723×10^{-5}	5.115
DQB1*06:02	HI vs N1	1.997×10^{-12}	0.036
	HI vs N2	5.773×10^{-4}	0.121
	N1 vs N2	0.02933	3.393
DQA1*01	HI vs N1	0.0077	0.259
	N1 vs N2	0.019	4.500

Quadro III – *Comparação das frequências dos alelos HLA-DQB1*02, HLA-DQB1*06:02 e HLA-DQA1*01 entre os grupos de doentes.* (Apresentam-se apenas os alelos para os quais foram encontradas diferenças com significado estatístico entre as populações.)

p – valor de prova; OR – odds ratio;

Relativamente às comparações entre as sub-populações formadas a partir da exclusão dos alelos DQB1*06:02 e DQB1*02 e as respectivas populações controlo, apenas foram observadas diferenças com significado estatístico na comparação entre doentes N1 e a população controlo, para o alelo HLA-DQB1*03, menos frequente entre os doentes N1 (31.25% vs 61.85%, com $p=0.017$ - não mostrado nos quadros). Para as sub-populações de doentes das outras entidades não foram encontradas diferenças relativamente à população controlo (N2 sem DQB1*06:02 vs PC sem DQB1*06:02 e HI sem DQB1*02 vs PC sem DQB1*02).

Os resultados das comparações entre estas sub-populações de doentes encontram-se representados no Gráfico I. A análise da frequência dos genes HLA-DQB1 e HLA-DQA1 evidenciou diferenças estatisticamente significativas relativamente aos alelos DQB1*05, DQA1*01, DQA1*02 e DQA1*03. A frequência do alelo DQB1*05 encontra-se aumentada no sub-grupo de doentes HI em relação aos restantes sub-grupos, sem terem sido observadas diferenças quando comparados estes últimos entre si (HI=57.69% vs N1=18.75% e N2=20.00%). A frequência do alelo DQA1*01 encontra-se aumentada no sub-grupo HI quando comparada com os restantes sub-grupos (HI=82.61% vs N1=66.67% vs N2=33.33%; valores de prova no Gráfico I), com significado estatístico apenas na comparação com o sub-grupo N2 ($p=0.0069$). Em relação ao alelo DQA1*02, a sua frequência encontra-se aumentada no sub-grupo N2 em relação aos restantes (N2=44.44% vs N1=33.33% e HI=8.70%), com significado estatístico apenas na comparação com a sub-população HI ($p=0.0198$). Por último, a frequência do alelo DQA1*03 encontra-se aumentada em N2 quando comparada com os outros sub-grupos (N2=55.56% vs HI=26.09% vs N1=13.33%), com diferença estatisticamente significativa apenas em relação ao sub-grupo N1 ($p=0.0276$).

Os resultados obtidos foram apresentados no trabalho “*Contribution of HLA characterization for the definition of the hypersomnolence*”, seleccionado como póster para a reunião da *European Narcolepsy Network*, realizado em Palma de Maiorca nos dias 17 a 19 de Março de 2017, e reproduzido no Anexo 1.

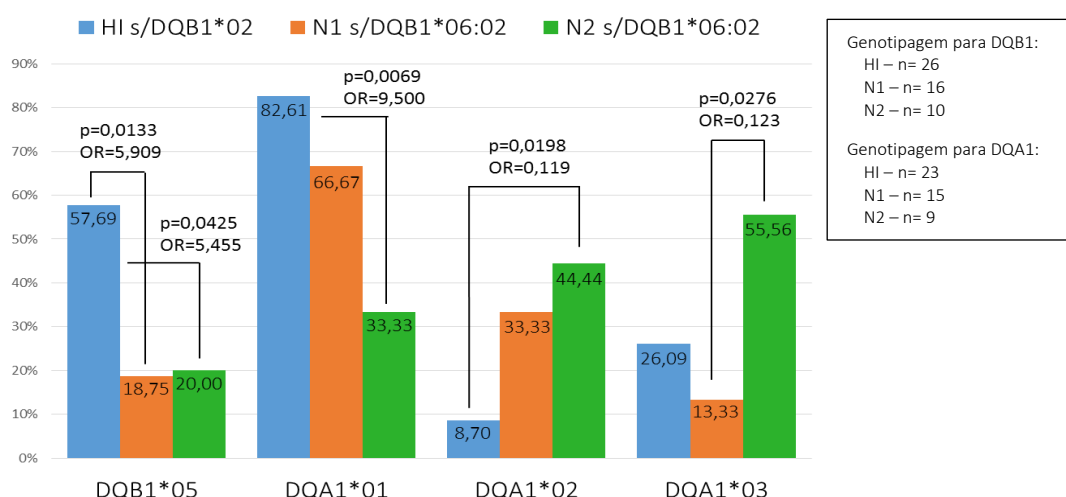


Gráfico I – **Diferenças estatísticas no HLA-DQ entre grupos de doentes (excluindo os alelos HLA-DQB1*06:02 e HLA-DQB1*02).** (Apresentam-se apenas os alelos para os quais foram encontradas diferenças com significado estatístico entre as populações.)

HI s/ DQB1*02 – doentes HI não portadores do alelo DQB1*02; N1 s/ DQB1*06:02 – doentes N1 não portadores do alelo DQB1*06:02; N2 s/ DQB1*06:02 – doentes N2 não portadores do alelo DQB1*06:02; p – valor de prova; OR – odds ratio;

DISCUSSÃO

O diagnóstico diferencial entre a Narcolepsia do Tipo 1, do Tipo 2 e a Hipersónia Idiopática é frequentemente dificultado pela elevada sobreposição clínica entre estas entidades, para além da coincidência de alguns dos critérios que as definem. Para ajudar à diferenciação entre as mesmas, tem sido proposta a utilização da genotipagem HLA da classe II, uma vez que alguns alelos destes genes foram reportados como mais frequentes em determinadas entidades. Com base nestas associações, propôs-se avaliar de que modo as diferentes distribuições alélicas poderiam ajudar a identificar com maior segurança a presença de um dos três distúrbios quando existem dúvidas no diagnóstico.

A maior frequência encontrada para o alelo HLA-DQB1*06:02 entre a população narcoléptica (em N1 e N2) corrobora o encontrado em estudos anteriores, confirmando este alelo como factor de suscetibilidade para a narcolepsia. Ainda que uma frequência de 70.37% na população N1 seja semelhante à descrita noutros trabalhos ^(9, 27) é bastante inferior em relação aos valores que rondam os 90% referida por outros ^(71, 72), o que poderá ser explicado pela composição da amostra destes estudos (uma vez que integram sobretudo doentes com cataplexia severa), bem como devido a diferenças no *background* genético da população em estudo. Também uma elevada frequência deste alelo foi encontrada entre a população de doentes N2, com cerca de 41% de doentes portadores do alelo, valor próximo dos que têm sido reportados ^(9, 71), assim como do indicado na própria ICSD-3 para doentes N2 (45%) ⁽¹⁾. Considerando que a comparação das frequências deste alelo entre os três grupos de doentes mostrou sempre diferenças significativas (N1 > N2 > HI) e com valores de p relevantes, o alelo contribuirá largamente para a distinção entre HI e as narcolepsias.

Curiosamente, foi encontrada na população N1 uma frequência inferior para o alelo DQB1*03, comparativamente à PC, com um valor de p significativo, o que coloca a hipótese de tratar-se de um alelo protector para a doença. O facto de este alelo voltar a surgir com uma frequência menor na sub-população N1 com exclusão do DQB1*06:02, quando comparada com a respectiva PC, apoia este efeito protector e sugere que o mesmo efeito seja independente da susceptibilidade para a doença conferida pelo DQB1*06:02. Tendo sido verificada esta menor frequência apenas em N1, o alelo poderia ser utilizado para a distinguir das restantes entidades. No entanto, estes dados contrariam outros estudos que sugeriram o alelo como factor de risco para N1 ^(25, 73).

Em relação à HI, a maior frequência do alelo DQB1*02 neste grupo em relação à PC, e com um valor de prova importante ($p = 3.888 \times 10^{-4}$), sugere que o alelo DQB1*02 poderá constituir um factor de susceptibilidade para a doença, tal como já descrito anteriormente ⁽⁶²⁾. Sendo também significativamente mais frequente em relação a N1, a presença do alelo poderá contribuir para a diferenciação entre as duas entidades. Recuperando a ideia de que doentes N2 portadores do alelo DQB1*06:02 são clínica e “laboratorialmente” próximos dos doentes N1, enquanto que doentes N2 não portadores se aproximam mais de doentes HI ⁽⁶⁸⁾, é sugerido por alguns autores que estes dois últimos grupos possam corresponder a diferentes fases do espectro de uma mesma entidade ⁽⁷⁴⁾. Admitindo esta hipótese, poderiam ser encontradas frequências alélicas semelhantes entre estes grupos. O facto de que a comparação entre as populações de doentes HI e N2 encontrar diferenças com significado estatístico apenas para o alelo DQB1*06:02 (N2 > HI) explicar-se-ia pelo efeito do sub-grupo de doentes N2 portadores deste alelo. Para

avaliar a hipótese de que a sub-população N2 possa ser semelhante à população HI, poder-se-ia fazer a comparação entre as frequências alélicas (para os genes DQB1 e DQA1) dos dois grupos, esperando-se que não surgissem diferenças com significado estatístico.

Como referido nos 'Resultados', a comparação entre a sub-população N2 com exclusão do DQB1*06:02 e a sub-população HI com exclusão do alelo DQB1*02 mostrou uma maior frequência do alelo DQA1*01 nos doentes HI e uma maior frequência do alelo DQA1*02 nos doentes N2, o que estará de acordo com a hipótese de que existam várias sub-populações de doentes entre N2 e HI, tal como se admite que ambas sejam entidades heterogêneas ^(1, 18). Esta comparação encontrou ainda uma maior frequência do alelo DQB1*05 nos doentes com HI, também observado quando esta sub-população HI é comparada com doentes N1 com exclusão do DQB1*06:02. Estas diferenças encontradas nas sub-populações de doentes podem ser utilizadas para a distinção entre as entidades, tal como discutido adiante.

A maior frequência do alelo DQA1*01 encontrada nas populações narcolépticas quando comparadas com a população HI, assim como na população em N1 relativamente a N2, está de acordo com o facto de o alelo DQA1*01:02 se encontrar em *linkage desequilibrium* com o alelo DQB1*06:02, pelo que o alelo DQA1*01 acompanhará a maior frequência deste.

Com base nestes resultados, propusemos o algoritmo representado na Figura 1, que poderá ser útil na diferenciação entre as entidades aqui discutidas. Seguindo o esquema deste algoritmo podemos chegar a várias hipóteses de diagnóstico quando estamos em presença de um doente com hipersonolência, para a qual diversas causas externas terão sido previamente excluídas. Perante as hipóteses possíveis, a presença de cataplexia desde logo aponta para N1, diagnóstico confirmado por critérios laboratoriais. A utilidade da "genotipagem" dos alelos do HLA-DQB1 e HLA-DQA1 tem relevância na diferenciação entre N1 e N2, mais propriamente quando a presença de cataplexia é dúbia. Neste caso, a presença do alelo HLA-DQB1*06:02 valida a presença do sintoma quando se suspeita de que esteja presente, o que permite o diagnóstico de N1 com maior segurança. Contrariamente, quando a cataplexia não é evidente, a ausência do alelo permite assumir com grande probabilidade que não existe défice de hipocretina (como se explicou na Introdução). Assume-se que a cataplexia não está presente e dirige-se o diagnóstico para N2. Nesta última situação, a positividade para o alelo HLA-DQA1*03 reforça o diagnóstico de N2.

A genotipagem do HLA-DQB1 terá também utilidade para a diferenciação entre N2 e HI. Na ausência de cataplexia e com os achados laboratoriais de estudo do sono não sendo suficientemente claros para distinguir entre estas duas entidades, a presença dos alelos DQB1*05 e/ou DQA1*01 sugerem o diagnóstico de HI em indivíduos não portadores dos alelos DQB1*02 e DQA1*06:02. Por oposição, nesta sub-população de indivíduos, a presença do alelo DQA1*02 sugere o diagnóstico de N2, que poderia ser ainda reforçado pela presença do alelo DQA1*03.

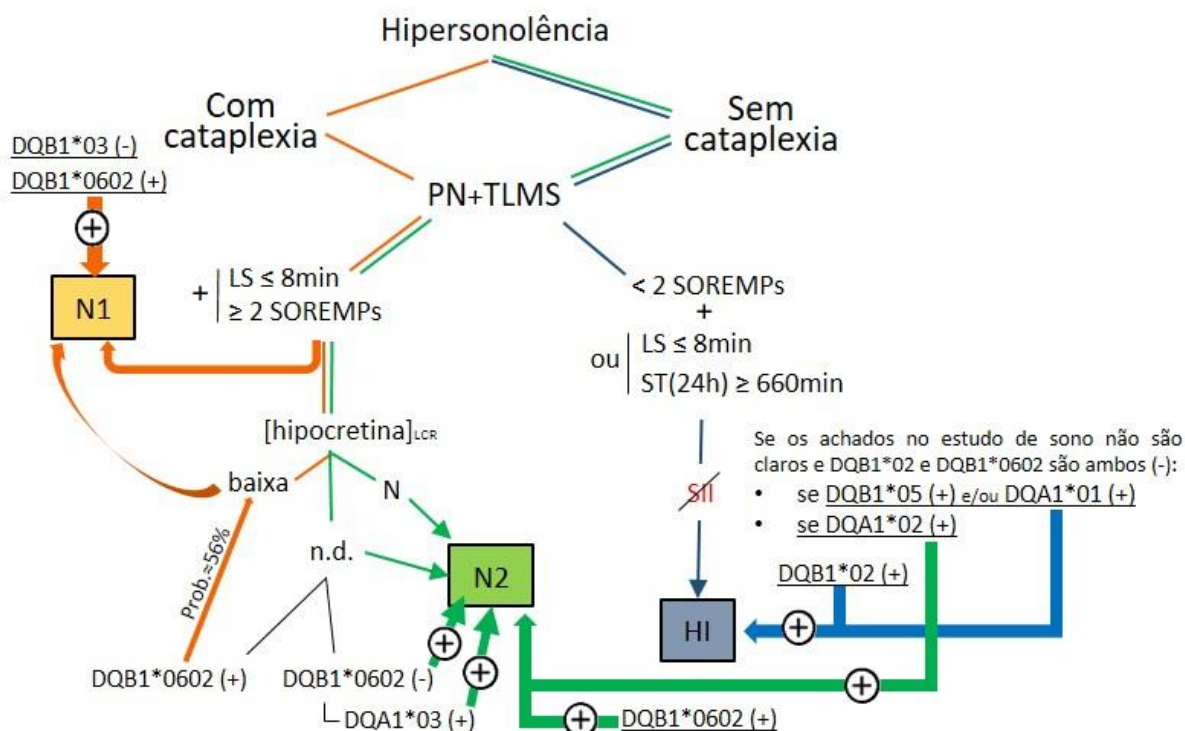


Figura I - **Algoritmo proposto para ajuda à diferenciação e ao diagnóstico entre Narcolepsia do Tipo 1 (N1), do Tipo 2 (N2) e Hipersônia Idiopática (HI).** (Os sinais “+” representam a orientação para o diagnóstico em causa.)
 PN – Polissonografia Nocturna; TLMS – Teste de Latências Múltiplas do Sono; LS – tempo de latência ao sono; SOREMPs – períodos de sono REM iniciados nos primeiros 15 minutos de sono; SII – Síndrome do Sono Insuficiente; [hipocretina]_{LCR} – concentração de hipocretina no líquido céfalo-raquidiano; N - valores normais de concentração de hipocretina no líquido céfalo-raquidiano; n.d. - concentração de hipocretina no líquido céfalo-raquidiano não determinada;

O estudo de uma população alargada contribuirá para a confirmação das diferenças alélicas entre as três entidades, acrescentando validade à utilização das mesmas enquanto elementos discriminadores na abordagem diagnóstica a estes doentes. De igual modo, uma amostra maior permitiria validar o efeito do alelo HLA-DQB1*03 sobre a narcolepsia.

Em conclusão, os estudos laboratoriais dos alelos HLA da classe II e a sua correlação com dados clínicos e registos poligráficos de sono (e análise conjunta dos mesmos) contribuem para a classificação das hipersonolências Narcolepsia do Tipo 1 e 2 (N1 e N2) e da Hipersônia Idiopática (HI). Adicionalmente, tal como descrevemos, o alelo HLA-DQB1*06:02 contribui não só para diferenciar as narcolepsias da HI, uma vez que é mais frequente nas primeiras, como também a sua identificação permite validar a existência de uma verdadeira cataplexia que seria inicialmente apenas suspeita, suportando assim o diagnóstico de N1, e distinguindo-o de N2 quando não há recurso ao doseamento de hipocretina. A identificação dos alelos HLA da classe II é também útil para a distinção entre N2 e HI. O alelo HLA-DQB1*02 pode ser usado para esta distinção quando presente (pois é mais frequente na HI), assim como se ausente, uma vez que se o HLA-DQB1*06:02 estiver igualmente ausente, a identificação do alelo DQA1*02 sugere N2, enquanto que a identificação do alelo DQB1*05 e/ou do alelo DQA1*01 sugere a HI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Medicine AAOs. Central Disorders of Hypersomnolence. In: ICSD 3. American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders: diagnostic and coding manual, 3rd Ed. Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2014, p. 143-85.
2. Dye TJ, Jain SV, Kothare SV. Central Hypersomnia. *Semin Pediatr Neurol*. 2015;22(2):93-104.
3. Kornum BR, Knudsen S, Ollila HM, Pizza F, Jennum PJ, Dauvilliers Y, et al. Narcolepsy. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:16100.
4. Littner MR, Kushida C, Wise M, Davila DG, Morgenthaler T, Lee-Chiong T, et al. Practice parameters for clinical use of the multiple sleep latency test and the maintenance of wakefulness test. *Sleep*. 2005;28(1):113-21.
5. Dement W, Rechtschaffen A, Gulevich G. The nature of the narcoleptic sleep attack. *Neurology*. 1966;16(1):18-33.
6. Serra L, Montagna P, Mignot E, Lugaresi E, Plazzi G. Cataplexy features in childhood narcolepsy. *Mov Disord*. 2008;23(6):858-65.
7. Overeem S, van Nues SJ, van der Zande WL, Donjacour CE, van Mierlo P, Lammers GJ. The clinical features of cataplexy: a questionnaire study in narcolepsy patients with and without hypocretin-1 deficiency. *Sleep Med*. 2011;12(1):12-8.
8. Guilleminault C, Mignot E, Partinen M. Controversies in the diagnosis of narcolepsy. *Sleep*. 1994;17(8 Suppl):S1-6.
9. Mignot E, Hayduk R, Black J, Grumet FC, Guilleminault C. HLA DQB1*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients. *Sleep*. 1997;20(11):1012-20.
10. Silber MH, Krahn LE, Olson EJ, Pankratz VS. The epidemiology of narcolepsy in Olmsted County, Minnesota: a population-based study. *Sleep*. 2002;25(2):197-202.
11. Andlauer O, Moore Ht, Hong SC, Dauvilliers Y, Kanbayashi T, Nishino S, et al. Predictors of hypocretin (orexin) deficiency in narcolepsy without cataplexy. *Sleep*. 2012;35(9):1247-55F.
12. Burgess CR, Tse G, Gillis L, Peever JH. Dopaminergic Regulation of Sleep and Cataplexy in a Murine Model of Narcolepsy. *Sleep*. 2010;33(10):1295-304.
13. Liblau RS, Vassalli A, Seifinejad A, Tafti M. Hypocretin (orexin) biology and the pathophysiology of narcolepsy with cataplexy. *Lancet Neurol*. 2015;14(3):318-28.
14. Knudsen S, Jennum PJ, Alving J, Sheikh SP, Gammeltoft S. Validation of the ICSD-2 criteria for CSF hypocretin-1 measurements in the diagnosis of narcolepsy in the Danish population. *Sleep*. 2010;33(2):169-76.
15. Lopez R, Barateau L, Evangelista E, Chenini S, Robert P, Jaussent I, et al. Temporal changes in the Cerebrospinal Fluid Level of Hypocretin-1 and Histamine in Narcolepsy. *Sleep*. 2016.
16. Morrish E, King MA, Smith IE, Shneerson JM. Factors associated with a delay in the diagnosis of narcolepsy. *Sleep Med*. 2004;5(1):37-41.
17. Khatami R, Luca G, Baumann CR, Bassetti CL, Bruni O, Canellas F, et al. The European Narcolepsy Network (EU-NN) database. *J Sleep Res*. 2016;25(3):356-64.
18. Khan Z, Trotti LM. Central Disorders of Hypersomnolence: Focus on the Narcolepsies and Idiopathic Hypersomnia. *Chest*. 2015;148(1):262-73.
19. Takei Y, Komada Y, Namba K, Sasai T, Nakamura M, Sugiura T, et al. Differences in findings of nocturnal polysomnography and multiple sleep latency test between narcolepsy and idiopathic hypersomnia. *Clin Neurophysiol*. 2012;123(1):137-41.
20. Dauvilliers Y, Montplaisir J, Molinari N, Carlander B, Ondze B, Besset A, et al. Age at onset of narcolepsy in two large populations of patients in France and Quebec. *Neurology*. 2001;57(11):2029-33.
21. Longstreth WT, Jr., Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, van Belle G. The epidemiology of narcolepsy. *Sleep*. 2007;30(1):13-26.
22. Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E. Narcolepsy with cataplexy. *Lancet*. 2007;369(9560):499-511.
23. Langdon N, Welsh KI, van Dam M, Vaughan RW, Parkes D. Genetic markers in narcolepsy. *Lancet*. 1984;2(8413):1178-80.
24. Juji T, Matsuki K, Tokunaga K, Naohara T, Honda Y. Narcolepsy and HLA in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;540:106-14.
25. Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Qiu X, Lin X, et al. Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy

- in three ethnic groups. *Am J Hum Genet.* 2001;68(3):686-99.
26. Tafti M, Hor H, Dauvilliers Y, Lammers GJ, Overeem S, Mayer G, et al. DQB1 locus alone explains most of the risk and protection in narcolepsy with cataplexy in Europe. *Sleep.* 2014;37(1):19-25.
 27. Okun ML, Lin L, Pelin Z, Hong S, Mignot E. Clinical aspects of narcolepsy-cataplexy across ethnic groups. *Sleep.* 2002;25(1):27-35.
 28. Hong SC, Lin L, Lo B, Jeong JH, Shin YK, Kim SY, et al. DQB1*0301 and DQB1*0601 modulate narcolepsy susceptibility in Koreans. *Hum Immunol.* 2007;68(1):59-68.
 29. Hor H, Kotalik Z, Dauvilliers Y, Valsesia A, Lammers GJ, Donjacour CE, et al. Genome-wide association study identifies new HLA class II haplotypes strongly protective against narcolepsy. *Nat Genet.* 2010;42(9):786-9.
 30. Ollila HM, Ravel JM, Han F, Faraco J, Lin L, Zheng X, et al. HLA-DPB1 and HLA class I confer risk of and protection from narcolepsy. *Am J Hum Genet.* 2015;96(1):136-46.
 31. Tafti M, Lammers GJ, Dauvilliers Y, Overeem S, Mayer G, Nowak J, et al. Narcolepsy-Associated HLA Class I Alleles Implicate Cell-Mediated Cytotoxicity. *Sleep.* 2016;39(3):581-7.
 32. Yamasaki M, Miyagawa T, Toyoda H, Khor SS, Liu X, Kuwabara H, et al. Evaluation of polygenic risks for narcolepsy and essential hypersomnia. *J Hum Genet.* 2016;61(10):873-8.
 33. Miller E, Andrews N, Stellitano L, Stowe J, Winstone AM, Shneerson J, et al. Risk of narcolepsy in children and young people receiving AS03 adjuvanted pandemic A/H1N1 2009 influenza vaccine: retrospective analysis. *BMJ.* 2013;346:f794.
 34. Picchioni D, Hope CR, Harsh JR. A case-control study of the environmental risk factors for narcolepsy. *Neuroepidemiology.* 2007;29(3-4):185-92.
 35. Han F, Lin L, Warby SC, Faraco J, Li J, Dong SX, et al. Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in China. *Ann Neurol.* 2011;70(3):410-7.
 36. Aran A, Lin L, Nevsimalova S, Plazzi G, Hong SC, Weiner K, et al. Elevated anti-streptococcal antibodies in patients with recent narcolepsy onset. *Sleep.* 2009;32(8):979-83.
 37. Ambati A, Poiret T, Svahn BM, Valentini D, Khademi M, Kockum I, et al. Increased beta-haemolytic group A streptococcal M6 serotype and streptodornase B-specific cellular immune responses in Swedish narcolepsy cases. *J Intern Med.* 2015;278(3):264-76.
 38. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell.* 1999;98(4):437-51.
 39. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell.* 1999;98(3):365-76.
 40. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron.* 2001;30(2):345-54.
 41. Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, et al. Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron.* 2003;38(5):715-30.
 42. Mahlios J, De la Herran-Arita AK, Mignot E. The autoimmune basis of narcolepsy. *Curr Opin Neurobiol.* 2013;23(5):767-73.
 43. Cvetkovic-Lopes V, Bayer L, Dorsaz S, Maret S, Pradervand S, Dauvilliers Y, et al. Elevated Tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients. *The Journal of Clinical Investigation.* 2010;120(3):713-9.
 44. Bergman P, Adori C, Vas S, Kai-Larsen Y, Sarkanen T, Cederlund A, et al. Narcolepsy patients have antibodies that stain distinct cell populations in rat brain and influence sleep patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(35):E3735-E44.
 45. Ahmed SS, Volkmuth W, Duca J, Corti L, Pallaoro M, Pezzicoli A, et al. Antibodies to influenza nucleoprotein cross-react with human hypocretin receptor 2. *Sci Transl Med.* 2015;7(294):294ra105.
 46. Baumann CR, Mignot E, Lammers GJ, Overeem S, Arnulf I, Rye D, et al. Challenges in diagnosing narcolepsy without cataplexy: a consensus statement. *Sleep.* 2014;37(6):1035-42.
 47. Vernet C, Leu-Semenescu S, Buzare MA, Arnulf I. Subjective symptoms in idiopathic hypersomnia: beyond excessive sleepiness. *J Sleep Res.* 2010;19(4):525-34.

48. Trotti LM. Waking up is the hardest thing I do all day: Sleep inertia and sleep drunkenness. *Sleep Med Rev.* 2016.
49. Billiard M. Diagnosis of narcolepsy and idiopathic hypersomnia. An update based on the International classification of sleep disorders, 2nd edition. *Sleep Med Rev.* 2007;11(5):377-88.
50. Vernet C, Arnulf I. Idiopathic hypersomnia with and without long sleep time: a controlled series of 75 patients. *Sleep.* 2009;32(6):753-9.
51. Pizza F, Vandi S, Detto S, Poli F, Franceschini C, Montagna P, et al. Different sleep onset criteria at the multiple sleep latency test (MSLT): an additional marker to differentiate central nervous system (CNS) hypersomnias. *J Sleep Res.* 2011;20(1 Pt 2):250-6.
52. Brezinova V. Sleep cycle content and sleep cycle duration. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1974;36(3):275-82.
53. Dauvilliers Y, Delalée N, Jausse I, Scholz S, Bayard S, Croyal M, et al. Normal cerebrospinal fluid histamine and tele-methylhistamine levels in hypersomnia conditions. *Sleep.* 2012;35(10):1359-66.
54. Kanbayashi T, Kodama T, Kondo H, Satoh S, Inoue Y, Chiba S, et al. CSF histamine contents in narcolepsy, idiopathic hypersomnia and obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep.* 2009;32(2):181-7.
55. Tanaka S, Honda M. IgG abnormality in narcolepsy and idiopathic hypersomnia. *PLoS One.* 2010;5(3):e9555.
56. Rye DB, Bliwise DL, Parker K, Trotti LM, Saini P, Fairley J, et al. Modulation of vigilance in the primary hypersomnias by endogenous enhancement of GABAA receptors. *Sci Transl Med.* 2012;4(161):161ra51.
57. Billiard M, Dauvilliers Y. Idiopathic Hypersomnia. *Sleep Med Rev.* 2001;5(5):349-58.
58. Billiard M, Merle C, Carlander B, Ondze B, Alvarez D, Besset A. Idiopathic hypersomnia. *Psychiatry Clin Neurosci.* 1998;52(2):125-9.
59. Coelho FM, Pradella-Hallinan M, Predazzoli Neto M, Bittencourt LR, Tufik S. Prevalence of the HLA-DQB1*0602 allele in narcolepsy and idiopathic hypersomnia patients seen at a sleep disorders outpatient unit in Sao Paulo. *Rev Bras Psiquiatr.* 2009;31(1):10-4.
60. Bassetti C, Aldrich MS. Idiopathic hypersomnia. A series of 42 patients. *Brain.* 1997;120 (Pt 8):1423-35.
61. Poirier G, Montplaisir J, Decary F, Momege D, Lebrun A. HLA antigens in narcolepsy and idiopathic central nervous system hypersomnolence. *Sleep.* 1986;9(1 Pt 2):153-8.
62. Martins-da-Silva A, Lopes J, Ramalheira J, Carvalho C, Cunha D, Costa PP, et al. Usefulness of genetic characterization of narcolepsy and hypersomnia on phenotype definition: a study in Portuguese patients. *Rev Neurol.* 2014;58(2):49-54.
63. Khor SS, Miyagawa T, Toyoda H, Yamasaki M, Kawamura Y, Tanii H, et al. Genome-wide association study of HLA-DQB1*06:02 negative essential hypersomnia. *PeerJ.* 2013;1:e66.
64. Sowa NA. Idiopathic Hypersomnia and Hypersomnolence Disorder: A Systematic Review of the Literature. *Psychosomatics.* 2016;57(2):152-64.
65. Ali M, Auger RR, Slocumb NL, Morgenthaler TI. Idiopathic hypersomnia: clinical features and response to treatment. *J Clin Sleep Med.* 2009;5(6):562-8.
66. Martinez-Rodriguez JE, Iranzo A, Casamitjana R, Graus F, Santamaria J. [Comparative analysis of patients with narcolepsy-cataplexy, narcolepsy without cataplexy and idiopathic hypersomnia]. *Medicina clinica.* 2007;128(10):361-4.
67. Billiard M, Sonka K. Idiopathic hypersomnia. *Sleep Med Rev.* 2016;29:23-33.
68. Sasai-Sakuma T, Inoue Y. Differences in electroencephalographic findings among categories of narcolepsy-spectrum disorders. *Sleep Med.* 2015;16(8):999-1005.
69. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
70. Aldener-Cannava A, Olerup O. HLA-DQB1 "low-resolution" typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP). *Eur J Immunogenet.* 1994;21(6):447-55.
71. Jeong JH, Hong SC, Shin YK, Han JH, Lee SP. HLA-DQB1 allele and hypocretin in Korean narcoleptics with cataplexy. *J Korean Med Sci.* 2007;22(1):127-31.
72. Nevsimalova S, Pisko J, Buskova J, Kemlink D, Prihodova I, Sonka K, et al. Narcolepsy: clinical differences and association with other sleep disorders in different age groups. *J Neurol.* 2013;260(3):767-75.

73. Han F, Lin L, Li J, Dong SX, An P, Zhao L, et al. HLA-DQ association and allele competition in Chinese narcolepsy. *Tissue Antigens*. 2012;80(4):328-35.

74. Roth B. *Narcolepsy & Hypersomnia*. Basel, Switzerland: S. Karger Ag; 1981.

- Anexo 1 -

Póster - *“Contribution of HLA characterization for the definition of the hypersomnolence”*

Contribution of HLA characterization for the definition of the hypersomnolence

BACKGROUND

The determination of HLA-DQB1 genotype is widely used to support the diagnosis of hypersomnolence namely Narcolepsy with cataplexy (N1), Narcolepsy without cataplexy (N2) and Idiopathic Hypersomnia (IH). The required use of HLA genotyping in clinical diagnosis was the result of several convergent reasons: the method is reliable, easy to perform and reassures the clinician; the assay is less invasive than other methodologies, namely those involving Cerebrospinal Fluid samples and one final contributing factor is the wide acceptance of the hypothesis of an autoimmune origin for Narcolepsy.

OBJECTIVES

The aim of the present study was to analyze the distribution of HLA-DQB1 and HLA-DQA1 alleles frequencies in Portuguese patients with different hypersomnolence syndromes and to test if such distribution is relevant for the definition of the type of such hypersomnolence.

PATIENTS AND METHODS

A cohort of 155 patients with hypersomnolence from the Sleep Outpatient Clinic of Hospital de Santo António/CH Porto was studied. Ten of these patients (7 with Kleine-Levin Syndrome, 1 with OSAS, 1 with Hypersomnia associated to Depression and Periodic Limb Movement Disorder, and 1 not classified for specific hypersomnolence) were excluded. From the 145 studied, 10 were not fully genotyped, and therefore also excluded. The final cohort of 135 patients, was assessed clinically, on the sleep laboratory (by a night PSG and a MSLT on the following day). The patients were classified as N1 (54), N2 (17) and IH (64), according to the ICSD-3 criteria for these 3 conditions. A Control Population (CP) of 206 healthy individuals from the same geographic origin was included.

All studied individuals were genotyped for HLA-DQB1* and HLA-DQA1* loci using a *Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers* (PCR-SSP). The alleles frequencies were determined by direct counting. HLA frequency differences in patients and controls were evaluated using the *Pearson chi-square test* or the *Fisher's exact test* as appropriate. Statistical analyses were done with SPSS v.23 software (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

- HLA-DQB1*06:02 was overrepresented in N2 and N1 patients (41.18% and 70.37%) when compared with CP (16.02%), $p = 9.46 \times 10^{-15}$ for N1.
- HLA-DQB1*02 frequency was increased in the population with hypersomnia when compared with the CP (59.38% vs. 34.47%; $p = 0.0004$).

Table 1. HLA-DQB1 allele frequencies of DQB1*02, DQB1*03 and DQB1*0602 in N1, N2 and IH patients and CP.

	Control Population (n=206)		Idiopathic Hypersomnia (n=64)				Narcolepsy type 1 (n=54)				Narcolepsy type 2 (n=17)			
	n	%	n	%	p	OR	n	%	p	OR	n	%	p	OR
DQB1*02	71	34.47	38	59.38	3.888 ⁻⁴	2.779	12	22.22	0.086	0.543	7	41.18	0.577	1.331
DQB1*03	116	56.31	32	50.00	0.376	0.776	18	33.33	0.0026	0.388	10	58.82	0.841	1.108
DQB1*0602	33	16.02	5	7.81	0.099	0.444	38	70.37	1.472 ⁻¹⁵	12.451	7	41.18	0.0094	3.670

Table 2. Comparison between patients groups.

	Comp.	p	OR
DQB1*02	IHvsN1	4,723 ⁻⁵	5.115
	IHvsN2	1,997 ⁻¹²	0.036
DQB1*0602	IHvsN1	5,773 ⁻⁴	0.121
	N1vsN2	0,02933	3.393
DQA1*01	IHvsN1	0,0077	0.259
	N1vsN2	0.019	4.500

Other alleles, beyond DQB1*06:02 and DQB1*02 were also analyzed and the results show:

- A significant decrease of the DQB1*03 allele in N1 relative to the Control Population (31.25% in N1 vs. 61.85% in CP, OR = 0.280 and $p=0.017$).

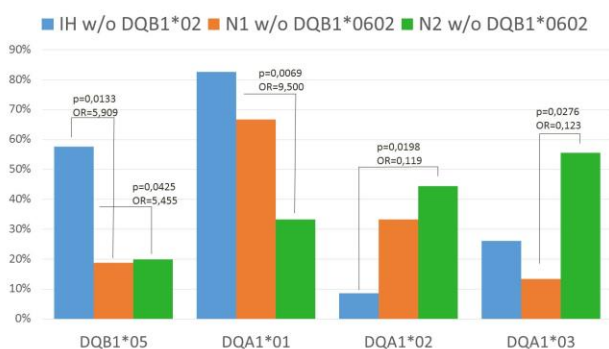


Figure 1. Significant differences in HLA-DQ between patients groups (excluding DQB1*06:02 and DQB1*02 alleles).

CONCLUSIONS

Based on these findings, we propose that the following successive approach algorithm, could be of help in the diagnosis of the different types of hypersomnolence:

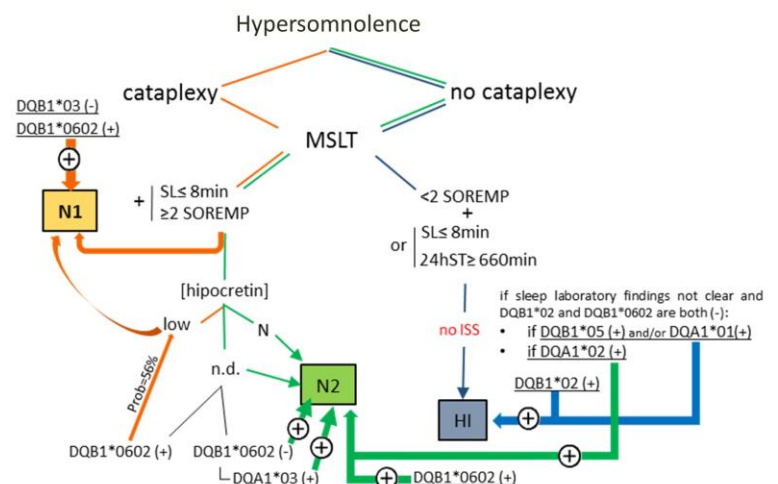


Figure 2. Proposed algorithm. Multiple Sleep Latency Test (MSLT); Sleep Latency (SL); Sleep Onset REM Period (SOREMP); Sleep Time (ST); Insufficient Sleep Syndrome (ISS); Normal [hipocretin]_{CS} (N); [hipocretin]_{CS} not determined (n.d.).